Proteínas del lactosuero en el período perinatal y leche madura de tapir (*Tapirus terrestris*)

Pérez, María Eugenia[1]; González Ciccia, Paula[3]; Zalazar, Raúl[3]; Rodríguez, Gabriel[2]; Fernández, Francisco[2]

[1] Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251, (4000) San Miguel de Tucumán, Argentina. maeuge75@hotmail.com
[2] Facultad de Ciencias Naturales e IML, Universidad Nacional de Tucumán, Miguel Lillo 205, (4000) San Miguel de Tucumán, Argentina.
[3] Fundación Temaikén, Buenos Aires, Argentina.

➤ **Resumen** — Se analizaron muestras de calostro y leche de tapir mediante electroforesis SDS-PAGE determinándose las concentraciones de las principales proteínas del lactosuero entre siete días anteriores y 36 días posteriores al nacimiento. Los resultados mostraron que las inmunoglobulinas, la seroalbúmina, la lactoferrina, la β-lactoglobulina y la α-lactalbúmina constituyen entre el 50% (leche madura) y el 60% (calostro) del total de las proteínas del lactosuero, el cual contiene más de 25 bandas electroforéticas. Se observaron variaciones en la expresión de las distintas proteínas a través del período analizado.

Palabras clave: Lactosuero, calostro, leche madura, proteínas, tapir.

➤ **Abstract** — "Lactoserum proteins in the perinatal period and mature milk of tapir (*Tapirus terrestris*)". Colostrum and milk samples of tapir were analyzed using SDS-PAGE electrophoresis. Concentration of the main proteins of lactoserum from seven days before and 36 days after birth were determined. Results showed that immunoglobulins, serumalbumin, lactoferrin, β-lactoglobulin and α-lactalbumin comprise 50% (mature milk) and 60% (colostrum) of the total lactoserum proteins. Lactoserum contains more than 25 electrophoretic bands. Variation in expression of different proteins during the period of study was detected.

Keywords: Lactoserum, colostrum, mature milk, proteins, tapir.

INTRODUCCIÓN

El tapir de tierras bajas, *Tapirus terrestris*, también llamado tapir sudamericano, tapir amazónico, anta (quechua) o mboreví (guaraní), es el mamífero terrestre sudamericano viviente de mayor tamaño. Esta especie es considerada importante desde el punto de vista ecológico, pues mediante la dispersión de semillas contribuye a mantener y mejorar los diferentes ambientes en donde vive (Quse y González Ciccia, 2008), lo cual asimismo resulta beneficioso para otras especies con las que comparte esos ecosistemas.

Los compuestos que se encuentran presentes en la leche de los mamíferos tienen al menos una triple función que incluye aspectos plástico-energéticos, de mensajeros químicos y de defensa contra infecciones (Fernández y Saad de Schoos, 1999). Las proteínas, particularmente, presentan una gran variabilidad interespecífica que refleja influencias de varios tipos: adaptativas y derivadas de su historia filogenética (Jenness, 1982; Oftedal, 1984).

El estudio de los componentes de la leche de tapir es del mayor interés puesto que constituye la base de la información necesaria para implementar gran parte de las medidas tendientes a promover la conservación de esta especie, una de las más emblemáticas de Argentina y de la región Neotropical. Existe muy poca información sobre las lactoproteínas de tapir, y ninguna que trate sobre las proteínas individuales del lactosuero. En parte, esto se debe a la dificultad de lograr las muestras adecuadas, ya que en Argentina al menos, los tapires hembras que se encuentran ex-situ y que permiten un manejo adecuado para la aplicación de un protocolo de extracción de muestras de leche no son más de 5, y que las pariciones ocurren

Recibido: 17/03/10 – Aceptado: 02/08/10

cada 2 o 3 años. Es por ello que consideramos un éxito haber logrado la obtención de las muestras con las cuales se realizó este trabajo. Dado que el tapir posee una baja tasa de natalidad, es imprescindible la supervivencia de cada cría para lo cual debe recibir los nutrientes necesarios así como también factores inmunológicos que la protejan en su primera etapa de vida.

A pesar que la leche provee todos los nutrientes necesarios para el apropiado crecimiento y desarrollo de los neonatos, se ha prestado poca atención a la caracterización de los cambios que podrían acompañar la transición desde calostro a leche madura (Aimutis *et al*., 1982). El calostro es un tipo especial de leche producido por los mamíferos al final de la preñez y durante los primeros días después del nacimiento. Se caracteriza por contener una gran cantidad y variedad de proteínas. La parte más heterogénea corresponde a las proteínas del lactosuero (PLS). Entre éstas son dominantes, en la mayor parte de las especies, las inmunoglobulinas (Igs), la seroalbúmina (SA), y la α-lactalbúmina (α-La). La presencia y abundancia del resto de las proteínas depende de la especie. En lo que se refiere al tapir, éstas no habían sido identificadas y por lo tanto sus funciones no se conocen, sobre todo en lo concerniente a lactoproteínas calostrales acerca de las cuales no hemos encontrado información en la literatura.

Este trabajo tiene como objetivo identificar las proteínas más importantes presentes en el período perinatal, determinar la magnitud cualitativa de las proteínas estructuralmente distintas existentes, y relacionado con ello la manera cómo cambian sus concentraciones relativas y absolutas en el primer mes de lactancia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 2 ejemplares hembras de tapir pertenecientes al Bioparque Temaikén (Escobar, Buenos Aires, Argentina), de una de ellas (A) se obtuvieron muestras secuenciales desde 7 días antes del nacimiento de la cría, hasta 36 días posteriores al mismo aplicando el protocolo de extracción y seguimiento (Fernández y Quse, 2006, a disposición de quien lo solicite al e-mail: maeuge75@hotmail.com), mientras que de la otra hembra (B) solo se obtuvo calostro. Del ejemplar perteneciente a la Reserva Experimental Horco Molle de la Universidad Nacional de Tucumán (C), se obtuvieron solo 3 muestras correspondientes a leche madura. Todas las muestras fueron obtenidas mediante ordeño manual y ninguna de las hembras presentaba signos de mastitis. El volumen obtenido varió entre 2 y 10 ml. Cada una de estas muestras fue recolectada usando como conservante una o dos gotas de solución de bicromato de potasio 1 % y luego fueron refrigeradas para su traslado. En el laboratorio, las muestras fueron divididas en alícuotas pequeñas y conservadas a -20 °C hasta el momento del estudio.

Para la obtención del lactosuero se procedió a la precipitación ácida de las caseínas mediante el agregado de buffer acetato y posterior centrifugación (Fernández y Hernández de Sánchez, 2006).

Se realizaron las determinaciones cuantitativas de los componentes mayores: las correspondientes a las proteínas totales y proteínas del lactosuero fueron llevadas a cabo según Lowry *et al.* (1955) con seroalbúmina bovina como estándar mientras que los valores de las caseínas se obtuvieron por diferencia entre las primeras y las proteínas del lactosuero (PLS). Los glúcidos se determinaron según Winzler (1955), utilizando lactosa como estándar. En primer término, se determinaron las concentraciones de glúcidos totales y, en segundo término, previa precipitación de las glicoproteínas con ácido tricloroacético, se determinaron las concentraciones de los glúcidos no unidos a proteínas.

Los lípidos fueron estimados por crematocrito (Hernández de Sánchez, 1999). Las electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), tanto con agentes reductores como en ausencia de éstos, fueron realizadas según Harris y Angal (1989). Básicamente ello se efectuó en geles de acrilamida al 12 % en placas de 0,7 x 70 x 70 mm a

una temperatura de 4 ºC y 120 V de voltaje constante. Después de la migración, fueron teñidos con Coomasie Brilliant Blue R 250. Posteriormente se realizó tinción con nitrato de plata (Rabilloud *et al.*, 1994) sobre estos mismos geles. Ello fue llevado a cabo porque habíamos observado que la doble tinción proporciona resultados mucho más representativos sobre la concentración de los distintos tipos de proteínas lácteas respecto a la sola tinción con Coomasie Brillant Blue (Pérez y Fernández, inédito). Los geles se escanearon y/o fotografiaron. Se realizó la digitalización de imágenes y a partir de las mismas mediante análisis densitométrico (software QuantiScan Biosoft, USA), se determinó el porcentaje de proteína correspondiente a cada banda electroforética.

A los fines analíticos, se consideró *precalostro* a la secreción que se va acumulando en la glándula mamaria en los últimos días antes del parto, *calostro* a la secreción láctea obtenida inmediatamente después del nacimiento de la cría hasta los 3 ó 4 días posteriores, *leche de transición* a la producida entre el cuarto y quinceavo día posparto y finalmente se denominó *leche madura* a la secreción producida luego del quinceavo día de lactación, período en el cual aumenta considerablemente la cantidad de leche que se produce.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1, se muestran las concentraciones de proteínas totales, proteínas del lactosuero, caseínas, glúcidos y lípidos de la secreción láctea entre 7 días anteriores y 36 días posteriores al nacimiento de la cría correspondientes al ensayo del protocolo de seguimiento.

Con respecto a los lípidos, en el precalostro, los valores no fueron detectables por el método empleado. En el calostro, leche de transición y leche madura se obtuvieron valores medios de 13,45 g/dL, 3 g/ dL y 1,7 g/dL respectivamente. Para los glúcidos se encontró una media de 1,6 g/dL en precalostro, 3 g/dL en calostro 4,1 g/dL, en leche de transición y 4,6 g/dL en leche madura en el primer mes de lactación (Tabla 1). Las determinaciones de glúcidos se llevaron a cabo después de precipitar las proteínas de las muestras con ácido tricloroacético de manera que el componente glucídico medido era fundamentalmente lactosa. Debido a que la lactosa y los oligosacáridos son los carbohidratos metabolizables y de uso inmediato en la obtención de energía por el recién nacido, los datos que se aportan en Tabla 1 son los que presentan mayor interés en este trabajo. Determinaciones de glúcidos llevadas a cabo en lactosuero antes de la precipitación

Tabla 1. Componentes mayores de la secreción láctea en diferentes estadíos de lactación del ejemplar tapir A, *Tapirus terrestris* (ver Métodos para más detalles). (*) Días anteriores y posteriores al nacimiento de la cría. N.D.: no detectable por el método empleado.

Períodos de lactación	Muestras*	Proteínas totales (g/dL)	Proteínas del lactosuero (g/dL)	Caseínas (g/dL)	Glúcidos (g/dL)	Lípidos (g/dL)
Precalostro	Día -7	37,3	22,6	14,7	0,7	N.D
	Día -6	25,8	18,1	7,7	1,4	N.D
	Día -4	24,6	9,3	11,1	1,9	N.D
	Día -2	20,2	13,3	6,9	2,4	N.D
Calostro	Día 0	20,1	12,4	7,7	2,5	21,0
	Día 3	13,3	6,75	6,6	3,5	6,0
Leche de transición	Día 7	10,9	4,15	6,8	3,8	4,2
	Día 11	8,4	4,35	4,1	4,3	1,8
Leche madura	Día 29	7,8	4,14	3,7	4,9	1,7
	Día 36	7,9	4,4	4,2	4,6	1,7

de proteínas con ácido tricloroacético, nos proporcionaron valores algo mayores, lo que pone en evidencia la importancia de las glicoproteínas en esta especie. En este sentido, los resultados del contenido total de glúcidos (lo que incluye a los unidos a las glicoproteínas) obtenidos previamente en cada uno de los días del seguimiento fueron, en g/dL: 4,4 (día -7); 3,6 (día -6); 4,8 (día -4); 5,2 (día -2); 8 (día 0); 6 (día 3); 7,6 (día 7); 10,5 (día 11); 10,9 (día 29) y 13 (día 36), respectivamente.

Existe una mayor cantidad de proteínas del lactosuero (PLS) en el calostro con relación a la leche madura, gran parte de esta diferencia es debida a la presencia de inmunoglobulinas. A partir de la medición de las proteínas totales en cada día de muestreo y de la intensidad relativa de las distintas bandas en los geles de las electroforesis, se hace evidente que casi todas las proteínas tienen mayor concentración en el período calostral (Figs. 1 y 2; Tabla 2).

Los resultados correspondientes a los análisis de las muestras de los otros dos anima-

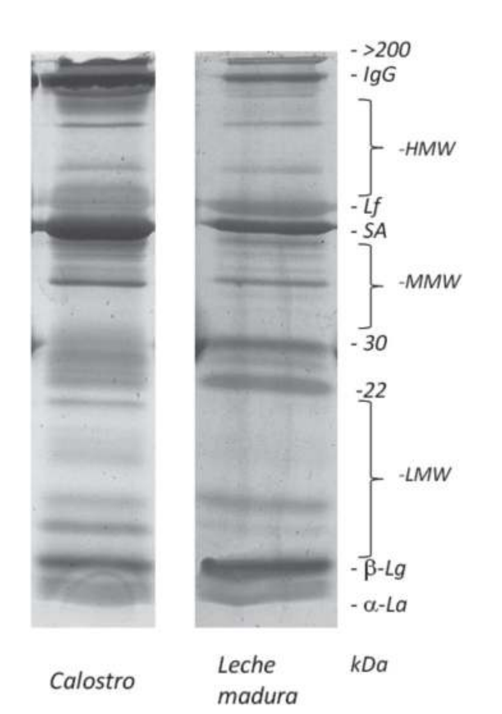


Figura 1. Electroforesis de lactosuero del período calostral y leche madura de tapir, *Tapirus terrestris*.

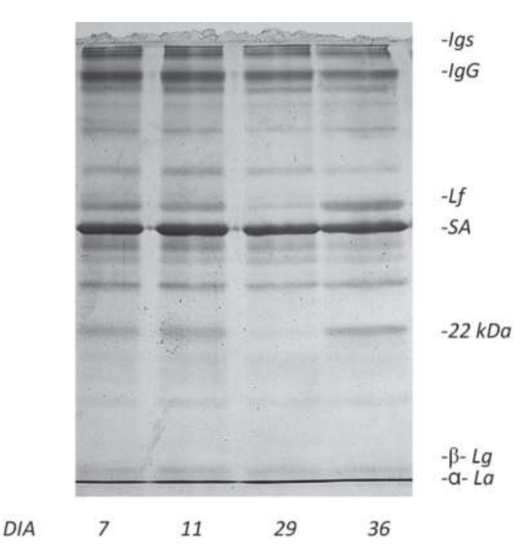


Figura 2. Electroforesis de muestras de los días 7º,11º, 29º y 36º llevada a cabo en condiciones tales que destacan las proteínas de masa molecular mayor a 30 kDa. Se observa la disminución de la expresión de la lactoferrina y de la proteína de aproximadamente 22 kDa en el día 29. (Igs: Inmunoglobulinas; Ig G: Inmunoglobulina G; Lf: Lactoferrina; SA: Seroalbúmina; 22 kDa: Proteína de 22 kDa.; β- Lg: beta- Lactoglobulina; α- La: alfa- Lactalbúmina).

Tabla 2. Porcentajes relativos de diferentes proteínas de lactosuero en calostro y leche madura de tapir, *Tapirus terrestris*. (= 200: Proteínas de peso molecular mayor a 200 kDa.; Ig G: Inmunoglobulina G; HMW: Proteínas de alto peso molecular; Lf: Lactoferrina; SA: Seroalbúmina; MMW: Proteínas de mediano peso molecular; Cns: Bandas menores correspondientes a M_r de Caseínas; LMW: Proteínas de bajo peso molecular; β- Lg: beta- Lactoglobulina; α- La: alfa- Lactalbúmina).

Banda	Calostro (% del total)	Leche madura (% del total)
>200	1,79	0,82
IgG	18,55	8,15
HMW	8,86	8,2
Lf	3,63	9,12
SA	21,71	13,48
MMW	7,3	10,1
Cns	14,42	20,59
LMW	9,24	10,16
β- Lg	8,44	14,03
α- La	6,08	5,35
total	100	100

les (B y C) fueron similares a los obtenidos en el ejemplar A sobre el cual se aplicó el protocolo de seguimiento antes mencionado. En la muestra de calostro del ejemplar B, los valores obtenidos fueron: 19 g/ dL proteínas totales; 10,8 g/dL PLS; 8,2 g/ dL Caseínas; 2,8 g/ dL Glúcidos y 25 g/ dL Lípidos. Para la muestra de leche madura del ejemplar C, los valores fueron: 8,6 g/ dL proteínas totales; 3,9 g/ dL PLS; 4,7 g/ dL Caseínas; 6 g/ dL Glúcidos y 1,8 g/ dL Lípidos.

Los resultados de las corridas electroforéticas de lactosuero en SDS-PAGE demostraron que el calostro de tapir presenta más de 25 bandas proteicas con masas moleculares que van desde los 14 kDa hasta > 150 kDa. En Fig. 1, se observan las bandas de las principales proteínas en el período calostral y en leche madura. Por reconocimiento de las bandas del marcador de masa molecular y por comparación de los patrones de migración de las proteínas con aquellos previamente publicados para leche de perisodáctilos, burra y yegua (UniProt, 2010), y otros mamíferos (Jensen *et al.,* 1995; Herrouin *et al.,* 2000; Malacarne *et al.,* 2002; Miranda *et al.,* 2004; Vincenzetti *et al.,* 2008), fue posible individualizar varias de las proteínas. Algunas de estas bandas proteicas fueron identificadas; tal es el caso de las inmunoglobulinas G (M_r aprox. 150 kDa.), lactoferrina (M_r aprox. 76 kDa.), seroalbúmina (M_r aprox. 67 kDa.), β-lactoglobulina (M_r aprox. 18 kDa.) y α-lactalbúmina (M_r aprox. 14 kDa.). El conjunto de estas cinco proteínas, más las proteínas de masa molecular mayor a 200 kDa conforman el 51 % del total de proteínas del lactosuero de leche madura y el 60 % de las proteínas calostrales (Tabla 2). Es llamativo el hecho que la seroalbúmina se expresa en cantidades mayores a lo que ocurre en otros perisodáctilos y en la mayoría de las especies de mamíferos estudiadas hasta el presente (Ribadeau-Dumas, 1993; Uniacke-Lowe *et al*., 2010). Su concentración en el calostro es casi tan alta como la correspondiente a la IgG. Debemos mencionar que la seroalbúmina de la leche ha sido señalada como la proteína que mejor contribuye a la provisión de aminoácidos para las crías en la especie humana (Sunehag y Haymond, 2003), lo cual puede aplicarse seguramente a numerosas otras especies dado el hecho que esta proteína es siempre uno de los componentes mayores de la leche. Ello no obsta a que existan diferencias entre especies (Ronayne de Ferrer y Sambucetti, 1993; Ronayne de Ferrer *et al*., 2000).

En la Tabla 2, se muestran los porcentajes correspondientes a las bandas electroforéticas analizadas, en la cual se han indicado las seis proteínas antes mencionadas y se ha distribuido al resto en cuatro grupos: uno de masa molecular alta (HMW); un segundo grupo de masas moleculares entre 65 y 35 kDa (MMW); un tercero con bandas correspondientes a la zona de las caseínas («cns»); y un cuarto con bandas de entre 25 y 18 kDa (LMW). La identidad de las proteínas de estos grupos, ó por lo menos de gran parte de ellas está siendo estudiada y posiblemente, será confirmada en un futuro próximo. Las proteínas de masa molecular mayor a 200 kDa constituyen dos bandas, las cuales consideramos que son las inmunoglobulinas M y A.

Los resultados obtenidos evidencian que la mayor parte de las proteínas del lactosuero van disminuyendo su concentración a partir del momento del nacimiento en las muestras consecutivas del seguimiento llevado a cabo. Asimismo se observó que aparece una nueva proteína no detectada en el calostro con los procedimientos utilizados en este trabajo, es el caso de la proteína correspondiente a una masa molecular aproximada de 22 kDa.

Hemos notado que algunas proteínas disminuyen su concentración y luego vuelven a incrementarse, tales son los casos de la lactoferrina y de la ya mencionada banda de ~ 22 kDa que muestran muy baja concentración en el análisis correspondiente al día 29 de lactación. Por otra parte, una proteína de ~ 20 kDa que está presente en el precalostro prácticamente desaparece dos días antes de la parición, reaparece en el calostro (día 0 y 3) y vuelve a desaparecer en la leche de transición y leche madura. Ello se evidencia en la Fig. 2, correspondiente a una electroforesis llevada a cabo en forma tal que se ob-

serven con mayor claridad a las proteínas de masas moleculares entre 20 y 200 kDa (días 7 a 36 post-nacimiento. No se muestran las fotografías de los días correspondientes al precalostro y calostro). La disminución por debajo del límite de detección de algunas bandas menores y su posterior reaparición abre un campo muy interesante que surge a partir de este seguimiento, y sobre lo cual no hemos encontrado bibliografía al respecto.

En perisodáctilos, la transmisión de inmunidad pasiva, es decir de las inmunoglobulinas ocurre solamente después del nacimiento a través del calostro (Langer, 2009). Como era previsible, ellas disminuyen rápidamente en los primeros días. Este hecho es más notorio en los ungulados donde se pueden observar las mayores diferencias en cuanto a concentración relativa de proteínas en calostro y leche madura (Berthon y Salmon, 1993; Reguilón *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 1999, Farrell *et al.,* 2004)

CONCLUSIONES

El calostro y leche madura de *Tapirus terrestris* presentan diferencias en la composición de las proteínas atribuibles a la función que cumplen en estas secreciones. Independientemente de las inmunoglobulinas, no todas las proteínas siguen la misma cinética de expresión. A pesar del hecho que la cantidad de bandas electroforéticas observables depende de la metodología empleada en su detección, factor que está en franco incremento en los últimos años (Conti et al., 2007), podemos afirmar que en condiciones de uso de metodologías similares, el calostro de tapir posee mayor número de proteínas que el calostro de otras especies conocidas sobre las cuales tenemos información a través de la bibliografía y de las experiencias realizadas en nuestro laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

A los señores árbitros, por las oportunas sugerencias. A la Fundación Temaikén y a la Reserva Experimental Horco Molle de la Universidad Nacional de Tucumán por la provisión de las muestras. A la Fundación Miguel Lillo y al Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (Proyecto 26G-415) por el financiamiento de este trabajo.

LITERATURA CITADA

Aimutis, W. R., Kornegay, E. T. y Eigel, W. N. 1982. Electrophoretic and biochemical comparison of casein and whey protein from porcine colostrum and milk. Journal of Dairy Science, 65:1874-1881.

Berthon, P. y Salmon, H.1993. Facteurs immunitaires des sécrétions mammaires. En: J. Martinet y L.M. Houdebine (eds.), Biologie de la lactation. Les Editions INSERM, INRA, Paris, France. 587 pp.

Conti, A., Giuffrida, M. G. y Cavaletto, M. 2007. Proteomics of human milk. En: V. Thongboonkerd (ed.), Proteomics of Human Body Fluids: Principles, Methods, and Applications. Humana Press Inc., Totowa, N. J, pp, 437- 451.

Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Hollar, C. M., Ng-Kwai-Hang, K. F. y Swaisgood, H. E. 2004. Nomenclature of the Proteins of Cows´ Milk-Sixth Revision. Journal of Dairy Science, 87: 1641-1674.

Fernández, F. M. y Saad de Schoos, S. 1999. Funciones de los componentes de la leche: Un enfoque biológico. Opera Lilloana, Fundación Miguel Lillo, 44: 1-164.

Fernández, F. M. y Hernández de Sánchez, M. 2006. Proteínas asociadas a las micelas de caseína en leche de mamíferos silvestres. Acta zoológica lilloana, 50(1-2): 109-113.

Fernández, F. M., Van Nieuwenhove, C., Medina, M., Oliver, G., Hernández, M., Cristóbal, R. y Saad, S. 1999. Composición del calostro y leche de corzuela (*Mazama gouazoubira*) (Artiodactila, Cervidae). Mastozoología Neotropical, 6(2): 97-103.

Harris, E. L. V. y Angal, S. 1989. Protein purification methods: A practical approach. IRL Press, Oxford University Press, England, 327 pp.

Hernández de Sánchez, M. B.1999. Estudio de las proteínas lácteas de *Myrmecophaga tridactyla*. Tesis de Magíster, Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina.

Herrouin, M., Molle, D., Fauquan, J., Ballestra, F., Maubois, J. L. y Leonil J. 2000. New genetic variants identified in donkey's milk whey proteins. Journal of Protein Chemistry, 19(2): 105-115.

Jenness, R. 1982. Interspecies comparison of milk proteins. En: P. F. Fox (ed.), Developments in Dairy Chemistry. Applied Science Publishers, London y New York, 1: 87-114.

Jensen, R., Oftedal, O. y Iverson, S. 1995. Comparative analysis of nonhuman milks. En: R. G. Jensen (ed.), Handbook of Milk Compositions. Academic Press, San Diego, New York, 991 pp.

Langer, P. 2009. Differences in the composition of colostrums and milk of eutherians reflect differences in immunoglobulin transfer. Journal of Mammalogy, 90(2): 332-339.

Lowry, O. N., Rosenbrough, J., Farr, A. L. y Randal, R. J. 1995. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275.

Malacarne, M., Martuzzi, F., Summer, A. y Mariani P. 2002. Protein and fat composition of mare´s milk: some nutritional remarks with reference to human and cow´s milk. International Dairy Journal, 12: 869-877.

Miranda, G., Mahé, M. F., Leroux, C. y Martin, P. 2004. Proteomic tools to characterize the protein fractions of Equidae milk. Proteomics, 4: 2496-2509.

Oftedal, O. T. 1984. Milk composition, milk yield and energy output at peak lactation: A comparative review. En: M. Peaker, R. G. Vernon y C. H. Knights (eds.), Physiological Strategies in Lactation. Zoological Society of London, Academic Press, London, 33-85 pp.

Quse, V. y González Ciccia, P. 2008. El Tapir, *Tapirus terrestris*, Aspectos Biológicos y Ecológicos: Manual y Atlas. Fundación Temaikén, Buenos Aires, Argentina, 128 pp.

Rabilloud, T., Chevallet, M. y Luche, S. 1994. Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. Cell and Molecular Biology, 40: 57-75.

Reguilón, C., Saad de Schoos, S. y Fernández, F. M.1996. Proteínas del calostro de llama (*Lama glama* L). Acta zoológica lilloana, 43 (2): 336-371.

Ribadeau-Dumas, B. 1993. Protéines du lait: structure et fonctions. En: J. Martinet y L.M. Houdebine (eds.), Biologie de la lactation. Les Editions INSERM, INRA, Paris, France, 587 pp.

Ronayne de Ferrer, P. y Sambucetti, M. E. 1993. Casein to whey ratio in rat and human milks: Effects of maternal protein intake. Journal of Dairy Science, 76: 1645-1653.

Ronayne de Ferrer, P., Baroni, A., Sambucetti, M. E., López, N. y Ceriani Cernadas, J. 2000. Lactoferrin levels in term and preterm milk. Journal of the American College of Nutrition, 19(3): 370-373.

Sunehag, A. y Haymond, M. W. 2003. Maternal protein homeostasis and milk protein synthesis during feeding and fasting in humans. American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism, 258: E420-E426.

Uniacke-Lowe, T., Huppertz, T. y Fox, P. F. 2010. Equine milk proteins: Chemistry, structure and nutritional significance. International Dairy Journal, 20 (9): 609-629.

Vincenzetti, S., Polidori, P., Mariani, P., Cammertoni, N., Fantuz, F. y Vita, A. 2008. Donkey´s milk protein fractions characterization. Food Chemistry, 106: 640-649.

Winzler, R. J.1955. Determination of serum glycoproteins. Methods of Biochemistry, 2: 279-311